



Kongeriget Danmark

Patent nr. DK/EP 0746608

Det europæiske patent på den opfindelse, som er angivet i vedlagte oversættelse af europæisk patentskrift, har fået virkning for Danmark. På patentskriftets forside findes oplysning om patenthaver, om dagen for Den Europæiske Patentmyndigheds bekendtgørelse af patentets meddelelse, om dagen for bekendtgørelse af dansk oversættelse af patentskriftet og om den europæiske indleveringsdag, som er dagen, fra hvilken patenttiden løber.

Patentets virkning for Danmark er meddelt i medfør af patentloven, jf. lovbekendtgørelse nr. 587 af 2. juli 1993.

27. oktober 2003

Patent- og Varemærkestyrelsen
Økonomi- og Erhvervsministeriet

Jesper Kongstad
Direktør



PATENT- OG VAREMÆRKESTYRELSEN

BEST AVAILABLE COPY

NZAS-0017188



Patent- og
Varemærkestyrelsen

(12) Oversættelse af
europæisk patentskrift

-
- (51) Int.Cl.: C 12 N 11/14 C 12 N 9/20 // C 01 B 33/20
- (45) Oversættelsen bekendtgjort den: 2003-10-27
- (80) Dato for Den Europæiske Patentmyndigheds bekendtgørelse om meddelelse af patentet: 2003-08-20
- (86) Europæisk ansøgning nr.: 95909664.5
- (86) Europæisk indleveringsdag: 1995-02-21
- (87) Den europæiske ansøgnings publiceringsdag: 1996-12-11
- (86) International ansøgning nr.: PCT/DK95/00076
- (87) Internationalt publikationsnr.: WO/9522606
- (30) Prioritet: 1994-02-21 DK 207/94
- (84) Designerede stater: AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL PT SE
- (73) Patenthaver: Novozymes A/S, Krogshøjvej 36, 2880 Bagsværd, Danmark
- (72) Opfinder: PEDERSEN, Sven, Novo Nordisk A/S, Novo Allé, 2880 Bagsværd, Danmark
LARSEN, Anne Morkeberg, Novo Nordisk A/S, Novo Allé, 2880 Bagsværd, Danmark
AASMUL, Per, Novo Nordisk A/S, Novo Allé, 2880 Bagsværd, Danmark
-

- (54) Benævnelse: Fremgangsmåde til fremstilling af et immobiliseret enzympræparat og anvendelse af det immobiliserede enzympræparat
- (56) Fremdragne publikationer:
EP-A- 0 093 027
EP-A- 0 159 578
EP-B- 0 382 767
WO-A-90/05778
WO-A-94/26883
KIRAN L KADAM: 'Introduction' GRANULATION TECHNOLOGY FOR BIOPRODUCTS 1990, BOCA RATON, pages 1 - 8
JOSEPH B SCHWARTZ: 'Theory of Granulation' GRANULATION TECHNOLOGY FOR BIOPRODUCTS 1990, BOCA RATON, pages 9 - 28
CELJTE CORPORATION: Technical Data for Celkate T-21

Opfindelsen omfatter en fremgangsmåde til fremstilling af et immobiliseret enzympræparat, der omfatter et enzym, som er anvendeligt til organisk syntese i et hovedsageligt organisk medium fri for frit vand, og en anvendelse af det immobiliserede enzympræparat. Det mest almindelige enzym, der er anvendeligt til organisk syntese i et hovedsageligt organisk medium fri for vand, er lipase. Eksempler på andre enzymer af denne slags er proteaser, amidaser, esteraser, oxidoreductaser og nitrilaser. I det følgende beskrives opfindelsen sædvanligvis med henvisning til lipase som det fremherskende eksempel på et enzym, der er anvendeligt til organisk syntese i et hovedsageligt organisk medium fri for vand. Udtrykket "organisk syntese" skal forstås som alment accepteret inden for organisk kemi. Typiske eksempler på organiske synteser, der er indbefattet inden for opfindelsens omfang, er således følgende: reesterificeringer, transesterificeringer, interesterificeringer, acyleringer, epoxideringer, aminolysen, ammoniolysen, oxidationer og reduktioner. Udtrykket "hovedsageligt organisk medium fri for frit vand" skal forstås som et medium med én fase, hvor den organiske del heraf beløber sig til mindst 50 % vægt/vægt.

Immobiliserede lipasepræparater anvendes som katalysatorer til interesterificering og andre fedtrelaterede processer, for eksempel fremstilling af kakao-smørsubstitut. Når der er tale om en batchreaktion, skal katalysatoren separeres fra reaktionsblandingen til genanvendelse, når reaktionen er afsluttet. En god katalysatorfiltreringsevne behøves således til tilfredsstillende ydeevne.

WO 90/05 778 beskriver en fremgangsmåde til fremstilling af et immobiliseret lipasepræparat, der for eksempel er anvendeligt til margarinefremstilling. Dette præparat omfatter en makroporøs silicabærer.

EP 140 542 beskriver et immobiliseret lipasepræparat til interesterificeringer af fedtstoffer. Dette præparat omfatter en harpiksanionbytterbærer.

Begge disse immobiliserede lipasepræparater ifølge kendt teknik har den ulempe, at de er kostbare. Især i forbindelse med fremstilling af margarine, der fremstilles i millioner af tons pr. år på global basis, er det vigtigt at minimere produktionsomkostninger.

Formålet med opfindelsen er således tilvejebringelse af en fremgangsmåde til fremstilling af et billigt immobiliseret enzympræparat, der bør udvise tekniske egenskaber, der er lig med eller næsten lig med immobiliserede enzympræparater ifølge kendt teknik, særligt med hensyn til filtreringsevne efter en afsluttet batchvis margarineproduktion og med hensyn til lavt tryktab i søjler til kontinuerlig ydeevne, i det tilfælde enzymet er en lipase, og en anvendelse af et sådant immobiliseret enzympræparat.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen til fremstilling af et immobiliseret enzympræparat, der omfatter et enzym, som er anvendeligt til organiske syntese i et hovedsageligt organisk medium fri for frit vand, er kendetegnet ved den kendsgerning, at en væskeformig enzymsammensætning og en partikelformet silicabærer med en partikelstørrelse under ca. 100 μm anvendes som materialer, der skal introduceres i en granulator eller ekstruder, hvorefter der udføres en granulation eller ekstrudering. Den væskeformige enzymsammensætning kan være ikke-vandig, for eksempel på alkoholbasis, eller vandig. Den partikelformede silicabærer kan udvise en bred partikelstørrelsesfordeling, for eksempel mellem ca. 5 og 100 μm . I denne patentbeskrivelse skal påberåbt "silica" forstås som enten silica eller et silicat, for eksempel magnesiumsilicat. Det er klart, at opfindelsen både omfatter den situation, hvor en partikelformet immobiliseret lipasesammensætning med en partikelstørrelsesfordeling svarende til den partikelformede silicabærers partikelstørrelsesfordeling først fremstilles, hvorefter granulationen eller ekstruderingen udføres (se eksemplerne 6 og 7), og den situation, hvor fremstillingen kun udføres i ét trin (se eksemplerne fra 1 til 5). Det er også klart, at enzymet kan virke som et bindemiddel under granulationen eller ekstruderingen, og/eller at et specifikt bindemiddel kan tilsættes, for eksempel gelatine eller polyvinylpyrrolidon. Under fremgangsmåden ifølge opfindelsen skal der fortrinsvis udføres en forstøvning, sædvanligvis en forstøvning af den væskeformige enzym-sammensætning og/eller en forstøvning af bindemidlet i væskeform. Det er også klart, at det apparatur, der anvendes i fremgangsmåden ifølge opfindelsen, ingen særlig vigtighed har for opfindelsen så meget som at en hvilken som helst granulator, for eksempel en fluid bed spraygranulator eller en hvilken som helst ekstruder, kan anvendes.

Et pulverformigt immobiliseret lipasepræparat på silicabasis er for eksempel beskrevet i WO 88/02 775, side 11, linierne 21-24. Dette immobiliserede

lipasepræparat er fuldstændigt uegnet til både batchvise og kontinuerlige fedtrelaterede processer på grund af ringe filtreringsevne efter en batchproces og dannelse af højt tryktab under en kontinuerlig proces med søjle.

5 Immobiliserede lipasepræparater er beskrevet i EP 579 928 og i Appl. Microbiol. Biotechnol. (1988) 28: 527-530, men ingen af disse lipasepræparater ifølge kendt teknik omfatter en silicabærer.

10 I Chem. Abstract bind 118 (1993): 55 095v er der beskrevet et immobiliseret lipasepræparat på en silicabærer. Fremgangsmåden ifølge opfindelsen, der omfatter bærerens partikelstørrelse og granulation eller ekstrudering, er imidlertid ikke beskrevet.

15 Det er overraskende blevet konstateret, at det immobiliserede enzympræparat, der fremstilles i overensstemmelse med fremgangsmåden ifølge opfindelsen, for det første er dramatisk billigere end de sammenlignelige immobiliserede enzympræparater ifølge kendt teknik, og for det andet, at det udviser tekniske egenskaber, der er lig med eller næsten lig med de immobiliserede enzympræparater ifølge kendt teknik, for eksempel med hensyn til
20 filtreringsevne efter en batchvis fedtrelateret proces og generering af et lavt tryktab under en kontinuerlig fedtrelateret proces, hvis enzymet er lipase.

En foretrukken udførelsesform af fremgangsmåden ifølge opfindelse er kendetegnet ved den kendsgeming, at enzymet er en lipase.

25 En foretrukken udførelsesform af fremgangsmåden ifølge opfindelse er kendetegnet ved den kendsgeming, at lipasen i den væskeformige lipase-sammensætning er en termostabil lipase.

30 En foretrukken udførelsesform af fremgangsmåden ifølge opfindelse er kendetegnet ved den kendsgeming, at lipasen i den væskeformige lipase-sammensætning fremstilles ved dyrkning af en mikroorganisme, der indeholder et gen, der indkoder for og udtrykker en lipase afledt ud fra en stamme af Humicola-arter, Candida antarctica eller Rhizomucor miehei.

35 En foretrukken udførelsesform af fremgangsmåden ifølge opfindelse er kendetegnet ved den kendsgeming, at forholdet mellem mængden af den væskeformige lipasesammensætning og vægten af partikelformet silicabærer

er mindst 100 000 LU/g bærer (tør vægt). LU er lipaseaktivitetenheden defineret i AF 95.1/2-GB, der efter anmodning kan opnås fra Novo Nordisk A/S. LU-assayet anvender tributyrin som substrat til bestemmelse af lipaseaktiviteten.

5

En foretrukken udførelsesform af fremgangsmåden ifølge opfindelse er kendetegnet ved den kendsgerning, at silicaet har en renhed på mindst 50 %, fortrinsvis mindst 75 %.

10

En foretrukken udførelsesform af fremgangsmåden ifølge opfindelse er kendetegnet ved den kendsgerning, at der anvendes en granulator, fortrinsvis et højhastighedsblendeapparat eller en blandegrانulator.

15

En foretrukken udførelsesform af fremgangsmåden ifølge opfindelse er kendetegnet ved den kendsgerning, at en væskeformig sammensætning af et bindemiddel, fortrinsvis gelatine eller polyvinylpyrrolidon, introduceres ved forstøvning i granulatoren eller ekstruderen under granulationen eller ekstruderingen.

20

En foretrukken udførelsesform af fremgangsmåden ifølge opfindelse er kendetegnet ved den kendsgerning, at granulationen eller ekstruderingen udføres ved fremstilling af det immobiliserede lipasepræparat med en partikelstørrelsesfordeling, der svarer til en mængde på mindst 90 % mellem 50 og 2000 μm .

25

Anvendelsen af det immobiliserede enzympræparat, der fremstilles ved hjælp af fremgangsmåden ifølge opfindelse, er til den proces, der katalyseres af enzymet.

30

Anvendelsen af det immobiliserede lipasepræparat, der fremstilles ved hjælp af fremgangsmåden ifølge opfindelsen, er til fedtrelaterede processer. Det er klart, at sådanne fedtrelaterede processer kan udføres batchvis eller kontinuerligt. Når de udføres batchvis, er det blevet konstateret, at det immobiliserede lipasepræparat, der fremstilles ved hjælp af fremgangsmåden ifølge opfindelse, udviser en tilfredsstillende filtreringevne, når den enzymatiske proces er blevet tilendebragt, og når de udføres kontinuerligt, er det blevet konstateret, at det immobiliserede lipasepræparat, der fremstilles

35

ved hjælp af fremgangsmåden ifølge opfindelse, udviser en god fysisk styrke, der resulterer i en tilfredsstillende søjleydeevne.

5 En foretrukken udførelsesform af anvendelsen ifølge opfindelse er til interesterificering af fedtstoffer og er kendetegnet ved den kendsgerning, at væskeformige fedtstoffer eller fedtblandinger, der indbefatter frie fedtsyrer eller fedt-syreestere, bringes i kontakt med det immobiliserede lipasepræparat.

10 En foretrukken udførelsesform af anvendelsen ifølge opfindelsen er til syntese af glycerider eller fedtsyreestere og er kendetegnet ved den kendsgerning, at en blanding af glycerol eller substituerede glyceroler eller andre typer af alkoholer og frie fedtsyrer bringes i kontakt med det immobiliserede lipasepræparat.

15 En foretrukken udførelsesform af anvendelsen ifølge opfindelsen er til syntese af glycolipider. Syntesen af glycolipider med immobiliserede lipasepræparater i almindelighed er beskrevet i Björkling, F. et al (1989), J. Chem. Soc., Chem. Commun., side 934-935.

20 Opfindelsen illustreres med de efterfølgende eksempler.

Alle fremstillingseksemplerne (1 - 8) illustrerer den batchvise udførelsesform af fremgangsmåden ifølge opfindelsen. Til produktion i industriel målestok foretrækkes sædvanligvis den kontinuertlige udførelsesform. Eksempel 9 er et anvendelses-eksempel.

30 Anvendelsen ifølge opfindelsen illustreres indirekte i eksemplerne 1 - 8 i betragtning af den kendsgerning, at hver BAUN-bestemmelse illustrerer anvendelsen (interesterificeringen) ifølge opfindelsen. Anvendelsen ifølge opfindelsen illustreres direkte i eksempel 9.

Fig. 1, der er direkte relateret til eksempel 9, viser omdannelsen i relation til en estersyntese udført som en operation med en kontinuertlig søjle som funktion af tiden.

EKSEMPLEREKSEMPEL 1

5 65 g af et pulver af syntetisk magnesiumsilicat, Celkate T-21 (Manville), blev introduceret i et højhastighedsblandeapparat med et vingehjul, der kan drives med en hastighed på 900 omdr. pr. min. 75 g væskeformigt Humicola lanuginosa lipase-koncentrat (fremstillet ifølge dansk patent nr. 157 560 med Humicola lanuginosa DSM 3819, tørstofindhold 30 %, med en aktivitet på 10 700 000 LU/ml) blev kontinuerligt forstøvet på silicapulveret i løbet af et tidsrum på ca. fem minutter med løbende vingehjul. Det dannede granulat blev tørret natten over ved stuetemperatur og sigtet (300 - 700 µm). Fugtighedsindholdet blev indstillet på 10 %, og prøven blev analyseret til 2,6 BAUN/g. Lipaseaktivitetsprøvningen udtrykt i BAUN (Batch Acidolysis Units Novo) måler starthastigheden af inkorporering af decansyre i solsikkeolie med højt oleatindhold (10 % vand, 70 °C). En detaljeret beskrivelse af metoden (MP 9 410 704 er tilgængelig fra Novo Nordisk A/S efter anmodning. Prøvningen blev udført uden magnetisk omrøring, men ved omrystning i vandbad.

20

EKSEMPEL 2

25 65 g Celkate T21 blev introduceret i et højhastighedsblandeapparat som angivet i eksempel 1. 25 g væskeformigt Humicola lanuginosa lipasekoncentrat som anført i eksempel 1 blev kontinuerligt forstøvet på pulveret med løbende vingehjul. Herefter blev 50 g af Humicola lanuginosa lipasekoncentratet med 3 % Kollidon K25 polyvinylpyrrolidon (BASF) forstøvet på pulveret. Det dannede granulat blev tørret natten over ved stuetemperatur og sigtet (300 - 700 µm). Fugtindholdet blev indstillet på 10 %, og prøven blev 30 analyseret til 0,5 BAUN/g.

EKSEMPEL 3

35 40 g af et pulver af et udglødet diatoméjord, Clarcel CBL 3 (Ceca S.A.), blev introduceret i et højhastighedsblandeapparat som angivet i eksempel 1. 11 g væskeformigt Humicola lanuginosa lipasekoncentrat som anført i eksempel 1 blev kontinuerligt forstøvet på pulveret med løbende vingehjul. Herefter blev

47 g af Humicola lanuginosa lipasen med 3 % (vægt/vægt) Kollidon K25 forstøvet på pulveret under løbende vingehjul. Det dannede granulat blev tørret natten over ved stuetemperatur og sigtet (300 - 700 µm). Fugtindholdet blev indstillet på 10 %, og prøven blev analyseret til 2,4 BAUN/g.

5

EKSEMPEL 4

50 g Clarcel CBL 3 blev introduceret i et højhastighedsblandeapparat som angivet i eksempel 1. 72 g væskeformigt Humicola lanuginosa lipasekoncentrat som anført i eksempel 1 med 5 % (vægt/vægt) gelatine (ASF gelatin, Sanofi Bio-Industries) blev kontinuert forstøvet på det væskeformige pulverkoncentrat som angivet i eksempel 1. Det dannede granulat blev tørret natten over ved stuetemperatur og sigtet (300 - 700 µm). Fugtindholdet blev indstillet på 10 %, og prøven blev analyseret til 5,1 BAUN/g.

10

15

EKSEMPEL 5

30 g Clarcel CBL 3 og 20 g talkumpulver blev introduceret i et højhastighedsblandeapparat som angivet i eksempel 1. 20 g væskeformigt Humicola lanuginosa lipasekoncentrat som anført i eksempel 1 blev kontinuert forstøvet på det væskeformige pulverkoncentrat som angivet i eksempel 1. Herefter blev 28 g af Humicola lanuginosa lipasekoncentratet med 2 % (vægt/vægt) Methocel A-15 methylcellulose (Dow) forstøvet på pulveret under løbende vingehjul. Det dannede granulat blev tørret natten over ved stuetemperatur og sigtet (300 - 700 µm). Fugtindholdet blev indstillet på 10 %, og prøven blev analyseret til 7,7 BAUN/g.

20

25

EKSEMPEL 6

30 25 g Celkate T-21 blev vasket med 3 voluminer 0,1 M acetatpuffer, pH 4,5, i 30 min efterfulgt af vakuumfiltrering. Humicola lanuginosa lipasekoncentrat som anført i eksempel 1 i en mængde, der svarede til 500 000 LU/g Celkate T-21, blev tilsat sammen med 3 voluminer 0,1 M acetatpuffer, pH 4,5, og omrørt i to timer ved stuetemperatur. Efter vakuumfiltrering blev den immobiliserede lipase tørret i 24 h ved stuetemperatur, fugtindholdet blev indstillet på 10 % og analyseret til 14,3 BAUN/g. Filtratet indeholdt 27 565 kLU, hvilket svarede til en adsorption på 78 % (eller 390 kLU/g).

35

5 65 g af den således tørrede immobiliserede lipase på Celkate T-21 pulver blev introduceret i et højhastighedsblandeapparat som anført i eksempel 1. 55 g af en 5 % (vægt/vægt) gelatineopløsning blev forstøvet på pulveret under løbende vingehjul. Herefter blev 0,1 g Aerosil 200 siliciumdioxid (Degussa) tilsat. Det dannede granulat blev tørret ved stuetemperatur og sigtet (300 - 700 μm). Fugtindholdet blev indstillet på 10 % og analyseret til 5,9 BAUN/g.

EKSEMPEL 7

10 200 g Clarcel CBL 3 blev vasket med 3 voluminer 0,1 M acetatpuffer, pH 4,5, i 30 min efterfulgt af vakuumfiltrering. Humicola lanuginosa lipasekoncentrat som anført i eksempel 1 i en mængde, der svarede til 500 000 LU/g Clarcel CBL 3, blev tilsat sammen med 3 voluminer 0,1 M acetatpuffer, pH 4,5, og omrørt i to timer ved stuetemperatur. Efter vakuumfiltrering blev den
15 immobiliserede lipase vasket to gange med 2 - 3 voluminer 0,1 M acetatpuffer, pH 4,5, og to gange med deioniseret vand. Filtraterne indeholdt 82 761 kLU i alt, hvilket svarede til en adsorption på 17 % (eller 86 kLU/g). Den immobiliserede lipase blev tørret i 24 h ved stuetemperatur og analyseret til 13,4 BAUN/g.

20 55 g af den således vaskede immobiliserede lipase på Clarcel CBL 3 pulver blev introduceret i et højhastighedsblandeapparat som anført i eksempel 1. 61 g af en opløsning, der indeholdt 2 % (vægt/vægt) gelatine og 1 % (vægt/vægt) Methocel A-15 methylcellulose (Dow), blev kontinuerligt forstøvet
25 på pulveret under løbende vingehjul. Herefter blev 0,1 g Aerosil 200 siliciumdioxid (Degussa) tilsat. Det dannede granulat blev tørret ved stuetemperatur og sigtet (300 - 700 μm). Fugtindholdet blev indstillet på 10 % og analyseret til 8,4 BAUN/g.

30 En anden portion, dvs. 59 g af den således vaskede immobiliserede lipase på Clarcel CBL 3 pulver, blev introduceret i et højhastighedsblandeapparat som anført i eksempel 1. 59 g af en 5 % (vægt/vægt) gelatineopløsning blev kontinuerligt forstøvet på pulveret under løbende vingehjul. Herefter blev 0,1 g
35 Aerosil 200 siliciumdioxid (Degussa) tilsat. Det dannede granulat blev tørret ved stuetemperatur og sigtet (300 - 700 μm). Fugtindholdet blev indstillet på 10 % og analyseret til 10,1 BAUN/g.

EKSEMPEL 8

Dette er et fremstillingseksempel som eksemplerne 1 – 7, men med en anden lipaseproducerende mikroorganisme.

5

Fremstilling af prøve 1: 12,9 g frysetørret *Candida antarctica* B lipasepulver med en aktivitet på 250 000 LU/g og 1,4 g Kollidon K25 blev opløst i 51 ml deioniseret vand. 50 g Celkate T-21 blev introduceret i et højtryksblendeapparat som anført i eksempel 1, og den ovenfor anførte opløsning af *Candida antarctica* B lipase blev kontinuerligt forstøvet på pulveret under løbende vingehjul. Det dannede granulat blev tørret natten over ved stuetemperatur og sigtet (300 - 1000 µm).

10

Fremstilling af prøve 2: 12,9 g *Candida antarctica* B lipase og 0,86 g Methocel A-15 blev opløst i 51 ml deioniseret vand. 50 g Celkate T-21 blev introduceret i et højtryksblendeapparat, og den ovennævnte opløsning blev kontinuerligt forstøvet på pulveret under løbende vingehjul. Det dannede granulat blev tørret natten over ved stuetemperatur og sigtet (300 - 1000 µm).

15

Fremstilling af prøve 3: 12,8 g *Candida antarctica* B lipase og 0,81 g Kollidon K25 blev opløst i 48 ml deioniseret vand. 50 g Celkate T-21 blev introduceret i et højtryksblendeapparat, og den ovennævnte opløsning blev kontinuerligt forstøvet på pulveret under løbende vingehjul. Det dannede granulat blev tørret natten over ved stuetemperatur og sigtet (300 - 1000 µm).

20

25

EKSEMPEL 9

Dette er et anvendelseksempel med fremstilling ifølge eksempel 8 associeret med fig. 1.

30

De tre prøver beskrevet i eksempel 8 blev evalueret i søjler ved kontinuerlig syntese af ethylglucosidestere (EGE) ved omsætning af ethylglucosid (EG) med decansyre.

Reaktionsbetingelser:

Søjledimensioner:	diameter = 1,5 cm; længde = 20 cm	
Prøvestørrelse:	5,0 g	
Substrat:	Ethylglucosid*)	4,98 kg
	Decansyre	4,92 kg
	Tertiær butanol 25 %	3,30 kg
Temperatur:	60 °C	
Flow:	30 g/h	
Tid:	162 h	

5 *) Syntetiseret ved omsætning af ethanol og D-glucose i nærvær af en kationbytter

Der blev udtaget prøver efter 18, 44, 90 og 162 h, og indholdet af EGE og EG blev målt på HPLC og % omdannelse beregnet. Resultaterne er vist i fig. 1. Det blev derudover bemærket, at prøvemeres fysiske stabilitet var god.

Patentkrav

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et immobiliseret lipasepræparat, der omfatter:
- 5
- a) introduktion af en væskeformig lipasesammensætning og en partikelformet silica- eller silicatbærer, der har en partikelstørrelse under 100 μm , i en granulator eller ekstruder og
- 10
- b) udførelse af en granulation eller ekstrudering til dannelse af det immobiliserede lipasepræparat.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, hvor a) og b) udføres i et enkelt trin.
- 15
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, hvor a) og b) udføres successivt.
4. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-3, hvor lipasen er afledt ud fra en stamme af *Humicola*, *Candida antarctica* eller *Rhizomucor miehei*.
- 20
5. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-4, hvor silicaet eller silicatet har en renhed på mindst 50 %.
6. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-5, hvor silicatet er magnesiumsilicat.
- 25
7. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-6, hvor granulatoren er en fluid bed spraygranulator, et højhastighedsblandeapparat eller en blandegranulator.
- 30
8. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-7, hvor et bindemiddel tilsættes til granulatoren eller ekstruderen under granulationen eller ekstruderingen.
- 35
9. Fremgangsmåde ifølge krav 8, hvor en væskeformig sammensætning af bindemidlet introduceres ved forstøvning i granulatoren eller ekstruderen under granulationen eller ekstruderingen.

10. Fremgangsmåde ifølge krav 8 eller 9, hvor bindemidlet er gelatine eller polyvinylpyrrolidon.

5 11. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-10, hvor den væskeformige lipasesammensætning introduceres ved forstøvning i granulatoren eller ekstruderen under granulationen eller ekstruderingen.

1/1

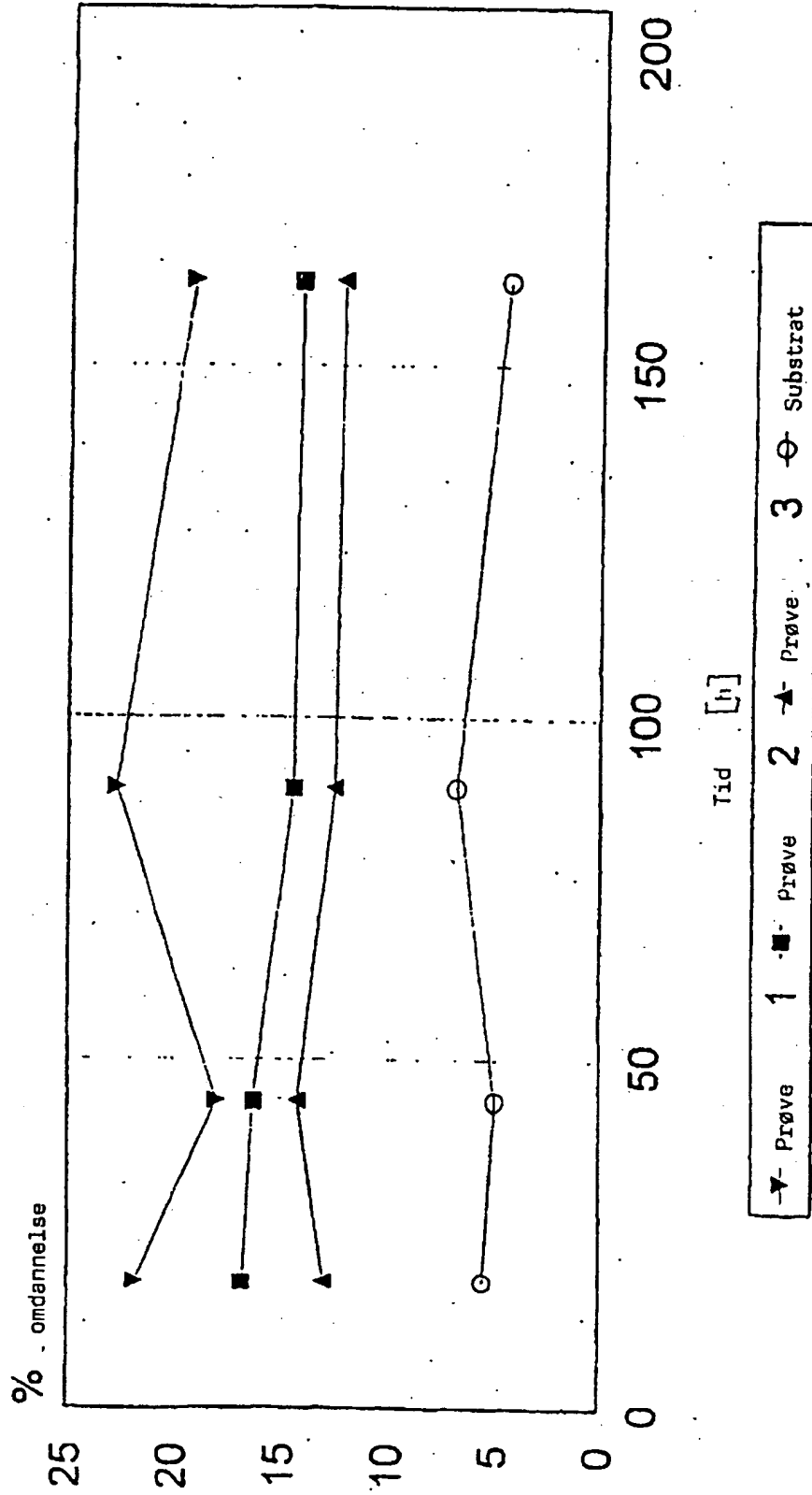


FIG. 1

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT OR DRAWING
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- GRAY SCALE DOCUMENTS
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.